

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : 2 779 153
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : 99 05861

⑤① Int Cl⁶ : C 12 N 15/12, C 07 H 21/04, C 12 Q 1/68

⑫ DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 07.05.99.

③⑦ Priorité : 07.05.98 FR 09805809.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 03.12.99 Bulletin 99/48.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA — FR et UNI-
VERSITÉ DE LIMOGES — FR.

⑦② Inventeur(s) : OULMOUDEN AHMAD, GALLET
PAUL FRANCOIS, ROUZAUD FRANCOIS, MARTIN
JULIETTE, DELOURME DIDIER, PETIT JEAN
MICHEL, LEVEZIEL HUBERT, MENISSIER
FRANCOIS, JULIEN RAYMOND et GROSCLAUDE
FRANCOIS.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET DEMA-
CHY SARL.

⑤④ SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR LA MISE EN OEUVRE D'UN PROCEDE D'IDENTIFICATION
GENETIQUE DE POPULATIONS BOVINES ET DE PRODUITS DERIVES.

⑤⑦ La présente invention a pour objet l'utilisation de sé-
quences nucléotidiques correspondant aux différentes for-
mes alléliques du gène Extension du génome bovin, encore
désigné gène E, ou correspondant à des fragments de ces
différentes formes alléliques, pour la mise en oeuvre d'un
procédé d'identification des différentes populations ou ra-
ces bovines, ou de différents troupeaux bovins regroupant
chacun plusieurs populations ou races bovines.

FR 2 779 153 - A1



BEST AVAILABLE COPY

SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR LA MISE EN ŒUVRE D'UN PROCEDE D'IDENTIFICATION GENETIQUE DE POPULATIONS BOVINES ET DE PRODUITS DERIVES

5

La présente invention a pour objet l'utilisation de séquences nucléotidiques dans le cadre de la mise en œuvre d'un procédé d'identification génétique de populations bovines, et plus particulièrement de populations bovines françaises, et de produits dérivés.

10

Le gène *Extension* code un récepteur de l'hormone de stimulation des mélanocytes (ou hormone MSH), et a été décrit dans l'article de Vanetti et al., FEBS Letters, 348, 268-272 (1994).

15

Ce récepteur de MSH joue un rôle majeur dans la régulation de la synthèse du pigment noir (ou eumélanine) ou du pigment rouge (phaeomélanine) à l'intérieur des mélanocytes.

Trois allèles du gène *Extension* ont été décrits jusqu'à présent, à savoir l'allèle *E* (encore désigné *E*⁺), l'allèle *E*^D et l'allèle *e* représentés sur la figure 1, et décrits dans l'article de Klungland et al., Mammalian Genome, 6, 636-639 (1995).

20

Il a été déterminé, dans l'article de Klungland et al. susmentionné, que l'allèle *E*^D porte une mutation spécifique d'un nucléotide faisant apparaître un site *AcI*I et que cet allèle *E*^D dominant est lié à la couleur noire des robes de la population ou race bovine norvégienne NRF, tandis que la délétion d'un nucléotide au niveau d'un site *Bsr*FI présent dans l'allèle *e*, produit chez cette population bovine norvégienne une robe de couleur rouge pour le génotype *e/e*. L'allèle sauvage *E* est lié à plusieurs

25

couleurs possibles de robes. Toutefois, les génotypes des autres races ou populations bovines norvégiennes déterminés dans l'article de Klungland et al. susmentionné, par détection de la présence de ces trois allèles *E*⁺, *E*^D et *e*, ne se sont pas révélés suffisamment caractéristiques pour permettre aux auteurs de cet article de conclure sur la possibilité d'utiliser ces allèles pour l'identification de populations bovines particulières, ou de troupeaux bovins particuliers.

30

35

Ainsi, à l'heure actuelle, l'identification des populations ou races bovines peut être essentiellement effectuée par observation des caractéristiques phénotypiques (telles que la couleur de la robe, des extrémités, des muqueuses, du contour des yeux, ou le cornage, la conformation, le port de l'animal) de l'animal entier sur pied, ou juste après abattage, et, le cas échéant, à l'aide d'un suivi administratif rigoureux de l'animal depuis sa naissance jusqu'à l'abattoir.

De telles méthodes reposent sur des critères globaux qui ne permettent pas toujours d'identifier avec certitude ou bonne précision la population ou race bovine à laquelle appartient l'animal, et ce, surtout lorsque l'on ne dispose pas d'un suivi administratif rigoureux de cet animal.

5 Par ailleurs, ces méthodes sont effectuées sur l'animal entier, mais ne permettent pas de contrôler l'origine de produits dérivés des animaux, à savoir principalement des produits commerciaux tels que sang, viandes, abats, os, embryons, spermes, ovules.

10 Un des buts de la présente invention est de fournir des séquences nucléotidiques permettant l'identification de populations ou races bovines, ou de troupeaux bovins regroupant plusieurs populations ou races bovines, à partir d'un échantillon biologique prélevé sur l'animal.

L'invention a également pour but de fournir de nouveaux procédés d'identification de populations ou races bovines, ou de troupeaux bovins, effectués à 15 partir d'échantillons biologiques prélevés sur les animaux.

Un autre but de l'invention est celui de fournir de nouveaux procédés permettant de contrôler, voire de certifier, l'appartenance, ou la non appartenance, d'un animal, ou d'un produit dérivé de ce dernier, à une population ou race bovine déterminée, ou à un troupeau bovin déterminé.

20 L'invention a également pour but de fournir de nouvelles amorces pour l'amplification génique, ainsi que des sondes nucléotidiques, utilisables dans le cadre de la mise en œuvre des procédés susmentionnés.

Un autre but de l'invention est celui de fournir des kits (ou trousse) pour la mise en œuvre des procédés susmentionnés.

25 L'invention découle de la découverte faite par les inventeurs, d'un nouvel allèle du gène *Extension* (ou gène *E*), ce nouvel allèle étant désigné dans ce qui suit allèle *E_I*, et est représenté sur la figure 1.

L'invention est illustrée à l'aide des figures 1 à 3 suivantes :

30 - Figure 1 : alignements comparés des séquences nucléotidiques des quatre allèles *E*, *e*, *E^D*, et *E_I*, identifiés dans les populations bovines d'origine française,

- Figure 2 : positionnement des amorces "sens" (encore désignée Ia ci-après) et "antisens" (encore désignée IIa ci-après) et des sites de clivage potentiels par les endonucléases *AciI* et *BsrFI* sur des fragments de 473 pb de l'allèle *E_I*, 461 pb des allèles *E* et *E^D*, et 460 pb de l'allèle *e*; le positionnement des amorces est indiqué à 35 l'aide de flèches horizontales, et celui des sites de clivage à l'aide de flèches verticales,

- Figure 3 : représentation des différents génotypes observés du gène *Extension* dans des populations ou races bovines françaises, en comparaison avec l'ensemble des génotypes possibles ;

A : avant digestion par les enzymes *Acil* et *BsrFI* ; les pics de gauche à droite correspondent respectivement au fragment de 460 ou 461 nucléotides caractéristique des allèles *e*, ou *E* et *E^D*, respectivement, et à celui de 473 nucléotides caractéristique de l'allèle *E_I*, lesdits fragments étant eux-mêmes obtenus par amplification à l'aide des amorces Ia et IIa susmentionnées ;

B : après digestion par les enzymes *Acil* et *BsrFI* des fragments obtenus par amplification à l'aide des amorces Ia et IIa susmentionnées ; les pics de gauche à droite correspondent respectivement :

. au fragment de 59 nucléotides caractéristique de l'allèle *E^D*,

. au fragment de 71 nucléotides caractéristique, en combinaison avec le fragment de 461 nucléotides susmentionné, de l'allèle *E*, ou en combinaison avec le fragment de 473 nucléotides susmentionné, de l'allèle *E_I*,

. et au fragment de 91 nucléotides caractéristique de l'allèle *e*.

L'invention a pour objet l'utilisation de séquences nucléotidiques correspondant aux différentes formes alléliques du gène *Extension* du génome bovin, ou correspondant à des fragments de ces différentes formes alléliques, pour la mise en oeuvre d'un procédé d'identification des différentes populations ou races bovines, ou de différents troupeaux bovins regroupant chacun plusieurs populations ou races bovines.

En d'autres termes, l'invention a pour objet l'application du typage des allèles du gène *Extension*, et plus particulièrement des allèles *E_I*, *E*, *E^D* et *e*, à la mise en oeuvre de procédés, tels que décrits ci-après, d'identification spécifique de populations ou races bovines, ou de troupeaux bovins, permettant de certifier l'appartenance d'un animal donné à une population ou race, ou à un troupeau particulier, ou, au contraire, de certifier l'exclusion de cet animal de cette population ou race, ou de ce troupeau particulier.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de séquences nucléotidiques correspondant à l'allèle *E_I*, représenté sur la figure 1, ou à des fragments de l'allèle *E_I*, en combinaison avec les séquences nucléotidiques correspondant aux différentes formes alléliques *E*, *E^D* et *e*, représentées sur la figure 1, ou à des fragments de ces différentes formes alléliques, pour la mise en oeuvre d'un procédé d'identification susmentionné.

Avantageusement les fragments de l'allèle *E_I* utilisés dans le cadre de la présente invention sont :

- soit des fragments susceptibles d'être détectés, notamment les fragments de l'allèle E_I décrits ci-après, et plus particulièrement ceux comprenant au moins la séquence nucléotidique délimitée par le nucléotide situé aux environs de la position 285 (plus ou moins un ou deux nucléotides) et le nucléotide situé en position 681 de la séquence de l'allèle E_I représenté sur la figure 1, notamment le fragment de 473 pb représenté sur la figure 2,

- soit des amorces utilisées par couple, et choisies de telle façon que l'une des deux séquences d'un couple d'amorces s'hybride avec une séquence d'environ 10 à environ 30 nucléotides comprise dans la séquence nucléotidique complémentaire de la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et environ 285 (plus ou moins un ou deux nucléotides) des séquences nucléotidiques des allèles E , e , E^D , ou E_I , représentées sur la figure 1, tandis que l'autre séquence de ce même couple s'hybride avec une séquence d'environ 10 à environ 30 nucléotides comprise entre les nucléotides situés aux positions 670 et 954 des séquences nucléotidiques des allèles E ou E^D représentées sur la figure 1, ou comprise entre les nucléotides situés aux positions 669 et 953, ou 682 et 966 des séquences nucléotidiques représentées sur la figure 1 des allèles e et E_I respectivement, notamment le couple d'amorces Ia/IIa décrit ci-après.

L'invention a également pour objet l'utilisation de séquences nucléotidiques susmentionnées, pour la mise en oeuvre d'une méthode de contrôle, voire de certification, de l'appartenance ou de la non-appartenance d'un animal à une population ou race bovine particulière, ou à un troupeau bovin particulier, comme par exemple à un troupeau laitier ou boucher.

L'invention a également pour objet l'utilisation de séquences nucléotidiques susmentionnées, pour la mise en oeuvre de méthodes telles que définies ci-dessus d'identification de populations ou races bovines ou de troupeaux bovins d'origine française.

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle correspond à l'allèle E_I représenté sur la figure 1, ou aux fragments suivants de l'allèle E_I :

- tout fragment contenant la séquence nucléotidique délimitée, d'une part, par le nucléotide situé à la position 285 (plus ou moins deux nucléotides), et, d'autre part, par le nucléotide situé à la position 681 de la séquence nucléotidique de l'allèle E_I représentée sur la figure 1, notamment le fragment de 473 paires de bases de l'allèle E_I représenté sur la figure 2,

- tout fragment contenant la séquence nucléotidique délimitée, d'une part, par un nucléotide situé entre les positions 1 et 285 (plus ou moins deux nucléotides), et, d'autre part, par le nucléotide situé à la position 307, de la séquence nucléotidique de

l'allèle E_I représentée sur la figure 1, notamment le fragment de 92 paires de bases délimité par les nucléotides situés aux positions 1 et 92 de la séquence nucléotidique de l'allèle E_I représentée sur la figure 2,

5 - tout fragment contenant la séquence nucléotidique délimitée, d'une part, par le nucléotide situé à la position 308 ou 328, et, d'autre part, par le nucléotide situé à la position 681 de la séquence nucléotidique de l'allèle E_I représentée sur la figure 1, notamment:

10 - tout fragment contenant la séquence nucléotidique délimitée, d'une part, par le nucléotide situé à la position 308 ou 328, et, d'autre part, par un nucléotide situé entre la position 691 (plus ou moins deux nucléotides), et la position 966 de la séquence nucléotidique de l'allèle E_I représentée sur la figure 1,

- le fragment de 381 paires de bases de l'allèle E_I , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle E_I représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides situés aux positions 93 et 473.

15 L'invention concerne également toute séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle correspond aux fragments suivants de l'allèle E^D :

- le fragment de 461 paires de bases de l'allèle E^D représenté sur la figure 2,
- le fragment de 59 paires de bases de l'allèle E^D , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle E^D représentée sur la figure 2, et délimitée par les
20 nucléotides situés aux positions 1 et 59.

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle correspond aux fragments suivants de l'allèle E :

- le fragment de 461 paires de bases de l'allèle E représenté sur la figure 2,
- le fragment de 71 paires de bases de l'allèle E , correspondant à la séquence
25 nucléotidique de l'allèle E représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 71,

- le fragment de 369 paires de bases de l'allèle E , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle E représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides situés aux positions 93 et 461.

30 L'invention concerne également toute séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle correspond aux fragments suivants de l'allèle e :

- le fragment de 460 paires de bases de l'allèle e représenté sur la figure 2,
- le fragment de 91 paires de bases de l'allèle e , correspondant à la séquence
35 nucléotidique de l'allèle e représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 91.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence nucléotidique Ia suivante ;

Ia : 5' CCTGGCTGTGTCTGACCTGCTGGTG 3'

5

ou tout fragment d'au moins environ 10 nucléotides contigus de cette séquence Ia, ou toute séquence dérivée de cette séquence Ia, ou d'un fragment susmentionné de cette dernière, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides de ces derniers, lesdits fragments ou séquences dérivées s'hybridant, tout comme la séquence Ia, avec tout ou partie de la séquence nucléotidique complémentaire des séquences nucléotidiques délimitées par les nucléotides situés aux positions 1 et 25, et représentées sur la figure 2, des allèles *E*, *e*, *E^D*, ou *E_I*.

10

L'invention a plus particulièrement encore pour objet toute séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend :

15

- la séquence nucléotidique IIa suivante ;

IIa : 5' GATGAATGGGGCGCTGCCTCTTCTG 3'

20

ou tout fragment d'au moins environ 10 nucléotides contigus de cette séquence IIa, ou toute séquence dérivée de cette séquence IIa, ou d'un fragment susmentionné de cette dernière, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides de ces derniers, lesdits fragments ou séquences dérivées s'hybridant, tout comme la séquence IIa, avec tout ou partie des séquences nucléotidiques délimitées par les nucléotides situés aux positions 449 et 473 de l'allèle *E_I*, ou 436 et 461 des allèles *E^D* et *E*, ou 435 et 460 de l'allèle *e*, et représentées sur la figure 2.

25

L'invention concerne également les couples d'amorces, dont chacune des deux amorces comprend, indépendamment l'une de l'autre, environ 10 à environ 30 nucléotides, lesdits couples d'amorces étant caractérisés en ce qu'ils sont choisis de telle façon que l'une des deux séquences d'un couple d'amorces s'hybride avec une séquence d'environ 10 à environ 30 nucléotides comprise dans la séquence nucléotidique complémentaire de la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et environ 285 des séquences nucléotidiques des allèles *E*, *e*, *E^D*, ou *E_I*, représentées sur la figure 1, tandis que l'autre séquence de ce même couple s'hybride avec une séquence d'environ 10 à environ 30 nucléotides comprise entre les nucléotides situés aux positions 670 et 954 des séquences nucléotidiques des allèles *E* ou *E^D* représentées sur la figure 1, ou comprise entre les nucléotides situés aux

30

35

positions 669 et 953, ou 682 et 966 des séquences nucléotidiques représentées sur la figure 1 des allèles *e* et *E_I* respectivement.

Des couples d'amorces (encore désignés ci-après I/II) pour l'amplification génique, et représentant des couples d'amorces préférés dans le cadre de la présente invention, sont ceux caractérisés en ce que :

- l'une des amorces est choisie parmi les séquences comprenant la séquence Ia, ou tout fragment ou toute séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus, ladite amorce étant avantageusement marquée, notamment de manière radioactive ou fluorescente,

- tandis que l'autre amorce est choisie parmi les séquences comprenant la séquence IIa, ou tout fragment ou toute séquence dérivée de cette dernière, tels que définis ci-dessus, ladite amorce étant avantageusement marquée, notamment de manière fluorescente (avantageusement avec un fluorochrome différent de celui utilisé pour le marquage de l'amorce précédente).

Un couple d'amorces particulièrement préféré est celui constitué des séquences Ia et IIa susmentionnées.

L'invention a également pour objet tout procédé d'identification de populations ou races bovines, ou de troupeaux bovins regroupant plusieurs populations ou races bovines, notamment des troupeaux laitier et boucher, ledit procédé étant effectué à partir d'un échantillon biologique prélevé sur l'animal, notamment à partir de sperme, embryon, sang, lait, poils, carcasse, abats, os, ou viande, ou autres produits dérivés de ces derniers, et permettant de contrôler, voire de certifier, l'appartenance ou la non-appartenance de l'animal sur lequel a été prélevé ledit échantillon biologique à une population ou race bovine, ou à un troupeau bovin particuliers, ce procédé comprenant :

- une étape d'amplification du nombre de copies des différentes formes alléliques du gène *E*, à savoir des allèles *E*, et/ou *e*, et/ou *E^D*, et/ou *E_I*, et/ou des fragments de ces formes alléliques, spécifiques d'une population ou race bovine ou d'un troupeau déterminés, et susceptibles d'être présents dans ledit échantillon biologique,

- une étape de détection desdites formes alléliques ou fragments de ces dernières, le cas échéant après digestion enzymatique de ces formes alléliques ou fragments, à l'aide d'enzymes de restriction appropriées,

- le cas échéant, la détection d'un ou plusieurs autres fragments d'ADN spécifiques de populations ou races bovines déterminées, afin de différencier lesdites populations bovines au sein d'un même troupeau, notamment de fragments d'ADN provenant de l'amplification de gènes ou de parties des gènes impliqués dans la coloration des robes des bovidés, notamment :

. le gène *c-kit* (Kubota, T., Hikono, H., Sasaki, E. and Sakurai, M. (1994) Sequence of a bovine *c-kit* proto-oncogene cDNA, *Gene*, **141**, 305-306),

. le gène *steel* (Zhou, J.H., Hikono, H., Ohtaki, M., Kubota, T. and Sakurai, M. (1994) Cloning and characterization of cDNAs encoding two normal isoforms of bovine stem cell factor, *Biochim. Biophys. Acta*, **1223**, 148-150),

. les gènes codant les récepteurs des endothélines (Saito, Y., Mizuno, T., Itakura, M., Suzuki, Ito, T., Hagiwara, H., and Hirose, S. (1991) Primary structure of bovine endothelin ETB receptor and identification of signal peptidase and metal proteinase cleavage sites, *J. Biol. Chem.*, **266**, 23433-23437),

. le gène *agouti* (Miller, M. W., Duhl, D.M.J., Vrieling, H., Cordes, S.P., Ollmann, M.M., Winkes, B.M. and Barsh, G.S. (1993) Cloning of the mouse *agouti* gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the Lethal-Yellow mutation, *Genes Dev.*, **7**, 454-467),

. le gène codant la tyrosinase (Del Marmol, V. and Beermann, F. (1996) Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation, *FEBS Lett.*, **381**, 165-168),

. les gènes codant les protéines reliées à la tyrosinase, tels que *TYRPI* (Nonneman, D., Shibuya, H. and Johnson, G.S. (1996) A BstUI PCR/RFLP in the bovine tyrosinase-related protein-1 (*TYRPI*) gene, *Anim. Genet.*, **27**, 218-219) et *TYRP2* (Jackson, I.J., (1998) A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the brown locus in mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4392-4396 ; Hawkins, G.A., Eggen A., Hayes, H., Elduque C., Bishop, M.B. (1996) Tyrosinase-related protein-2 (DCT ; *TYRPI*) maps to bovine chromosome 12, *Mammalian Genome*, **7**, 474-475).

L'invention a plus particulièrement pour objet tout procédé d'identification tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que l'étape d'amplification du nombre de copies des différentes formes alléliques du gène *E*, ou des fragments de ces formes alléliques, est effectué à l'aide d'un couple d'amorces tel que défini ci-dessus, permettant l'amplification du nombre de copies de tout allèle *E*, *e*, *ED*, ou *E_I*, représentés sur la figure 1, ou du nombre de copies de tout fragment des allèles *E*, *e*, *ED*, ou *E_I*, susmentionnés, lesdits fragments comprenant au moins les séquences nucléotidiques délimitées par les nucléotides situés aux positions 285 et 669 sur la figure 1, dans le cas des allèles *E* et *ED*, ou au moins la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 285 et 668 sur la figure 1, dans le cas de l'allèle *e*, ou au moins la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 285 et 681 sur la figure 1, dans le cas de l'allèle *E_I*.

Avantageusement, l'étape d'amplification du nombre de copies des différentes formes alléliques du gène *E*, et/ou des fragments de ces formes alléliques, dans le

cadre des procédés d'identification susmentionnés de l'invention, est effectuée à l'aide d'un couple d'amorces choisi parmi les couples I/II, et plus particulièrement le couple Ia/IIa, définis ci-dessus, permettant l'amplification du nombre de copies des fragments de 461 paires de bases des allèles *E* et *ED*, ou du fragment de 460 paires de bases de l'allèle *e*, ou du fragment de 473 paires de bases de l'allèle *E_I*, ces fragments étant représentés sur la figure 2.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout procédé d'identification tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que l'étape d'amplification génique est effectuée dans les conditions suivantes :

- 10 - le mélange réactionnel utilisé comprend :
 - . ADN présent dans l'échantillon (100 ng/ μ l) 2 μ l
 - . Amorces (10 pmol/ μ l) 2 μ l de chaque
 - . dNTP (2,5 mM de chaque) 2 μ l
 - . MgCl₂ (25 mM) 3 μ l
 - 15 . Tampon 10X (100 mM Tris-HCl pH9 ;
500 mM KCl ; 1% Triton X 100) 5 μ l
 - . Taq ADN polymérase (5 Unités/ μ l) 0,2 μ l
 - . H₂O q.s.p. 50 μ l
- les conditions d'amplification utilisées sont les suivantes :
 - 20 . 1 cycle comprenant les étapes suivantes :
 - Dénaturation 94°C - 5 mn
 - Hybridation 60°C - 30 s
 - Elongation 72°C - 1 mn
 - : 35 fois le cycle comprenant les étapes suivantes
 - 25 Dénaturation 94°C - 1 mn
 - Hybridation 60°C - 30 s
 - Elongation 72°C - 1 mn
 - . 1 cycle d'élongation à 72°C pendant 10 mn.

Avantageusement, la détection, après l'étape d'amplification effectuée dans le cadre de la mise en oeuvre d'un procédé d'identification selon l'invention, d'une séquence amplifiée contenant au moins la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 285 et 681 de l'allèle *E_I* représenté sur la figure 1, telle que la séquence amplifiée, lorsque le couple d'amorces utilisé est choisi parmi les couples I/II, et plus particulièrement le couple Ia/IIa, définis ci-dessus, correspondant au fragment de 473 paires de bases de l'allèle *E_I* représenté sur la figure 2, à savoir d'une séquence amplifiée dont la taille est supérieure de 12 ou de 13 paires de bases par rapport à la taille théorique des autres séquences susceptibles d'être amplifiées respectivement à partir des allèles *E* et *ED*, ou de l'allèle *e*, à l'aide

du couple d'amorces utilisé, correspond à la détection de la présence d'une forme allèlique E_I dans l'échantillon étudié.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout procédé d'identification tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend, après l'étape d'amplification, et le cas échéant, de détection de l'allèle E_I :

- une étape de digestion enzymatique à l'aide des enzymes de restriction *AclI* et *BsrFI* des différentes formes alléliques du gène *E*, ou des fragments de ces formes alléliques, ayant été amplifiés,

- suivie d'une étape de détection des éventuels différents fragments d'ADN susceptibles d'être obtenus après traitement par lesdites enzymes (encore désignés ci-après fragments de digestion), à savoir des fragments d'ADN suivants :

. tout fragment d'ADN correspondant à une séquence nucléotidique délimitée d'une part, par un nucléotide situé en l'une des positions 1 à environ 285, et, d'autre part, par le nucléotide situé en position 295 de la séquence nucléotidique de l'allèle E^D représentée sur la figure 1, notamment, lorsque le couple d'amorces utilisé est choisi parmi les couples I/II, et plus particulièrement le couple Ia/IIa, définis ci-dessus, le fragment de 59 paires de bases de l'allèle E^D susmentionné, et dont la détection est corrélable à la présence d'une forme allèlique E^D dans l'échantillon étudié,

. tout fragment d'ADN correspondant à une séquence nucléotidique délimitée d'une part, par un nucléotide situé en l'une des positions 1 à environ 285, et, d'autre part, par le nucléotide situé en position 307 de la séquence nucléotidique de l'allèle *E* représentée sur la figure 1, notamment, lorsque le couple d'amorces utilisé est choisi parmi les couples I/II, et plus particulièrement le couple Ia/IIa, définis ci-dessus, le fragment de 71 paires de bases susmentionné, correspondant à la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 71 de l'allèle *E* représentée sur la figure 2, et dont la détection, est corrélable à la présence d'une forme allèlique *E* dans l'échantillon étudié, (dans la mesure où une séquence amplifiée contenant au moins la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 285 et 669 de l'allèle *E* représenté sur la figure 1, telle que la séquence amplifiée, lorsque le couple d'amorces utilisé est choisi parmi les couples I/II, et plus particulièrement le couple Ia/IIa, définis ci-dessus, correspondant au fragment de 461 paires de bases de l'allèle *E* susmentionné, est détectée après l'étape d'amplification et avant celle de digestion enzymatique),

. tout fragment d'ADN correspondant à une séquence nucléotidique délimitée d'une part, par un nucléotide situé en l'une des positions 1 à environ 285, et, d'autre part, par le nucléotide situé en position 327 de la séquence nucléotidique de l'allèle *e* représentée sur la figure 1, notamment, lorsque le couple d'amorces utilisé est choisi

parmi les couples I/II, et plus particulièrement le couple Ia/IIa, définis ci-dessus, le fragment de 91 paires de bases susmentionné, correspondant à la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 91 de l'allèle *e* représentée sur la figure 2, et dont la détection est corrélable à la présence d'une

5

L'invention a plus particulièrement pour objet tout procédé d'identification tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que la double digestion par les endonucléases de restriction *BsrFI* et *AcilI*, des formes alléliques du gène *E* amplifiées, ou des fragments amplifiés de ces formes alléliques, est effectuée dans les conditions

10

- 25 μ l d'ADN (correspondant à 50 ng) des formes alléliques amplifiées du gène *E*, ou des fragments amplifiés de ces dernières,

- 1 U d'enzyme *BsrFI*

- 1 U d'enzyme *AcilI*

15

- 3 μ l tampon de digestion 10X

- H₂O q.s.p. 30 μ l,

et incubation de ce mélange pendant 30 mn à 37°C.

Avantageusement, la détection, dans le cadre des procédés d'identification susmentionnés de l'invention, des différentes formes alléliques amplifiées du gène *E*, ou des fragments amplifiés de ces formes alléliques, ou des fragments d'ADN obtenus après digestion enzymatique des formes alléliques ou fragments de ces dernières susmentionnés, est effectuée :

20

- par analyse de la taille des allèles ou fragments de ces derniers, ou des fragments de digestion susmentionnés, notamment par des techniques utilisant l'électrophorèse dans un capillaire, ou

25

- par visualisation de fragments de digestion susmentionnés, dans le cas où ces derniers proviennent de la digestion enzymatique de formes alléliques amplifiées du gène *E*, ou des fragments amplifiés de ces formes alléliques, eux-mêmes obtenus par amplification à l'aide d'amorces dont l'une au moins est marquée, notamment de manière radioactive ou fluorescente, cette amorce marquée étant hybridée avec une région des fragments de digestion en question, ou

30

- par utilisation de sondes nucléotidiques, le cas échéant marquées de la manière indiquée ci-dessus, s'hybridant spécifiquement avec les allèles ou fragments de ces derniers, ou avec les fragments de digestion susmentionnés.

35

L'invention a plus particulièrement pour objet tout procédé d'identification tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que :

- la détection d'un génotype comprenant une forme allélique *E_I* ou *e* dans l'échantillon biologique étudié, permet de certifier que ledit échantillon provient d'un

animal appartenant aux populations ou races bovines françaises suivantes : Aubrac, Blonde, Charolaise, Gasconne, Limousine, Maine-Anjou, Salers,

5 - la détection du génotype e/e dans l'échantillon biologique étudié, permet de certifier que ledit échantillon provient d'un animal appartenant à l'une des populations ou races bovines dont la robe contient une quantité variable de phaeomélanine, et comprenant principalement les populations bovines françaises suivantes : Blonde, Charolaise, Limousine, Maine-Anjou, Salers,

10 - la détection des génotypes E/E ou ED/ED , de même que l'absence de détection de génotypes comprenant une forme allélique E_I ou e , dans l'échantillon biologique étudié, permet de contrôler que les animaux sont supposés appartenir à l'une des populations ou races bovines françaises suivantes : Holstein (ED/ED) et Normande (E/E), dans lesquelles les allèles E_I et e n'ont jamais été rencontrés à ce jour.

Plus précisément, le procédé d'identification tel que défini ci-dessus est caractérisé en ce que :

15 - la détection d'un génotype comprenant l'allèle ED dans l'échantillon biologique étudié, permet de certifier que ledit échantillon provient d'un animal appartenant à l'une des populations ou races bovines dites "noires", telles que les races Vosgienne, Holstein (ou Prim'Holstein), ou Salers Noire,

20 - la détection d'un génotype comprenant l'allèle E_I dans l'échantillon biologique étudié, permet de certifier que ledit échantillon provient d'un animal appartenant à l'une des populations ou races bovines suivantes : Aubrac, Gasconne, Parthenaise, ou Maraîchine,

25 - la détection d'un génotype comprenant l'allèle e , mais ne comprenant pas l'allèle E_I ou ED dans l'échantillon biologique étudié, permet de certifier que ledit échantillon provient d'un animal appartenant à l'une des populations ou races bovines dites "rouges", telles que les races Salers, Maine Anjou, Bazadaise, Limousine, Charolaise, Blonde d'Aquitaine, ou Montbéliarde,

30 - la détection du génotypes E/E , dans l'échantillon biologique étudié, permet de contrôler que les animaux sont supposés appartenir principalement à la population ou race bovine française Normande.

35 L'invention vise plus particulièrement l'application des procédés d'identification décrits ci-dessus, au contrôle, voire la certification, de l'origine de produits dérivés des bovidés, à savoir principalement des produits commerciaux tels que sperme, ovule, embryon, sang, viandes, carcasses, abats, os, ou autres produits dérivés des produits susmentionnés, sur lesquels sont prélevés lesdits échantillons biologiques.

L'invention a également pour objet tout kit (ou trousse) pour la mise en oeuvre d'un procédé d'identification tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un couple d'amorces tel que défini ci-dessus, et plus particulièrement un

couple d'amorces choisi parmi les couples I/II susmentionnés, avantageusement le couple Ia/IIa susmentionné.

Avantageusement, les kits de l'invention comprennent également:

- une ADN polymérase thermorésistante, notamment de la Taq ADN polymérase, notamment à raison de 2 U, et/ou
- un milieu réactionnel obtenu à partir du tampon 10X, MgCl₂, et des 4 désoxynucléotides (dNTP) constitutifs des ADN (dCTP, dATP, dGTP, dTTP; notamment à raison de 2,5 mM chacun), et/ou
- une ou plusieurs enzymes de restriction, et plus particulièrement les enzymes *AclI* et *BsrFI*, notamment à raison d'1 U chacune, et/ou,
- une ou plusieurs sondes telles que définies ci-dessus.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de l'identification de populations ou races bovines et de troupeaux bovins particuliers, par mise en oeuvre d'un procédé de l'invention tel que décrit ci-dessus effectué au moyen du couple d'amorces Ia et IIa susmentionné.

1°) Extraction de l'ADN

Les cellules de l'échantillon en suspension dans un tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4) sont soumises à l'action conjuguée de la protéinase K (0,1 mg), de l'EDTA (25 mM, pH 8) et du SDS (0,5 % (p/v)). Après incubation de 1 h à 50°C, une solution saturée de NaCl est ajoutée (0,5 volume) et le mélange est centrifugé 15 min à 20 000xg et à 4°C. Le surnageant est alors mélangé avec 3 volumes d'éthanol absolu pour précipiter l'ADN génomique. La "pelote" obtenue est récupérée par aspiration et lavée deux fois avec 5 ml d'éthanol à 70% (v/v). L'ADN est ensuite remis en suspension dans l'eau (100 ng/ μ l) et conservé à 4°C.

2°) Conditions d'amplification par la technique de PCR

L'amplification spécifique de la région d'intérêt du gène *E* (*extension*) est réalisée avec les amorces "sens" (Ia) et "antisens" (IIa).

- séquences nucléotidiques des amorces :

Ia : "sens" : 5' CCTGGCTGTGTCTGACCTGCTGGTG 3'

|

6-FAM

IIa : "antisens" : 5' GATGAATGGGGCGCTGCCTCTTCTG 3'

- les conditions d'amplification sont les suivantes :

• Mélange réactionnel

ADN	2 μ l
Amorces (10 pmol/ μ l)	2 μ l de chaque
dNTP (2,5 mM)	2 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l
Tampon 10X	5 μ l
Taq DNA polymérase	0,2 μ l soit 2 U
H ₂ O q.s.p.	50 μ l

• Conditions d'amplification

Dénaturation	94°C - 5 min	
Hybridation	60°C - 30 sec	1 cycle
Elongation	72°C - 1 min	
Dénaturation	94°C - 1 min	
Hybridation	60°C - 30 sec	35 cycles
Elongation	72°C - 1 min	
Elongation	72°C - 10 min	1 cycle

A l'issue de la réaction, le mélange est déposé sur un gel d'agarose (1,2 % (p/v)) afin d'isoler le produit ADN amplifié et le récupérer par élution dans un volume final de 30 μ l.

3°) Digestion enzymatique du produit ADN amplifié

Le produit ADN est séparé en deux fractions :

- une fraction (5 μ l) destinée à l'analyse directe de la taille.
- une autre fraction est soumise à une double digestion par les endonucléases de restriction *BsrFI* et *Acil* dans les conditions suivantes :

- 25 μ l de produit ADN
- 1 U d'enzyme *BsrFI*
- 1 U d'enzyme *Acil*
- 3 μ l tampon de digestion 10X
- H₂O q.s.p. 30 μ l.

Le mélange est incubé 30 min à 37°C.

4°) Analyse de la taille des ADN

Les fragments ADN sont analysés à l'aide d'un système ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Perkin-Elmer), équipé d'un logiciel d'analyse génétique GeneScan. La séparation des fragments ADN, préalablement dénaturés 3 min à 95°C en présence de formamide déionisé, est effectuée par électrophorèse dans un capillaire. Ce dernier est équipé d'une fenêtre autorisant la mesure simultanée de la quantité et de la taille des fragments par fluorescence de l'amorce sens. Ce dispositif est programmable sur plusieurs jours.

5) Résultats

Les résultats sont indiqués sur les tableaux I et II ci-après, ainsi que sur la figure 3.

Tableau I : Génotypes observés pour quelques échantillons de diverses populations ou races bovines en France

Population	Nombre d'individus	Génotypes				
		<i>e / e</i>	<i>E / E</i>	<i>E / E₁</i>	<i>E^D / E^D</i>	<i>E₁ / E₁</i>
Aubrac	27	1	2	6	-	18
Blonde	12	12	-	-	-	-
Charolaise	11	11	-	-	-	-
Gasconne	23	-	7	9	-	7
Holstein	10	-	-	-	10	-
Limousine	13	13	-	-	-	-
Maine-Anjou	10	10	-	-	-	-
Normande	8	-	8	-	-	-
Salers	15	15	-	-	-	-

Total individus : 129

Comme nous l'avons vu ci-dessus, la présente invention résulte de la découverte faite par les Inventeurs, dans les populations ou races Aubrac et

Gasconne, d'un allèle du gène *E* (*Extension*), porteur d'une duplication de 12 nucléotides (Figures 1 et 2). Cet allèle est dénommé provisoirement *E_I*.

5 En combinant les caractéristiques de cet allèle avec celles des trois autres, à savoir *E*, *E^D*, et *e*, les Inventeurs ont mis au point un procédé rapide d'identification du génotype (les deux allèles parentaux) d'un individu pour le gène *E*.

10 Les caractéristiques principales de ce procédé d'identification sont basées :
a - sur une amplification génomique (technique PCR) à l'aide de deux amorces spécifiques, choisies en fonction des caractéristiques combinées des quatre allèles (Figure 2) :

- l'amorce "sens" est marquée par un fluorochrome 6-FAM (6-carboxyfluoresceine), fluorescent à 531 nm dans le bleu.
- 15 • l'amorce "antisens" est non fluorescente.

b - sur l'action simultanée de deux endonucléases de restriction (*BsrFI* et *AciI*) sur le produit d'amplification PCR.

c - et sur l'analyse de la taille (exprimée en nombre de nucléotides) des fragments obtenus avant et après digestion enzymatique.

20 Dans le cadre d'une première étude (Tableau I), la combinaison des résultats d'analyse conduit à un profil combiné des tailles de fragments distinguant les cinq génotypes rencontrés. La technique permet de distinguer les dix génotypes possibles (Figure 3). On remarquera que parmi l'ensemble des
25 génotypes possibles, seuls les génotypes *e/e*, *E/E*, *E/E_I*, *E^D/E^D*, *E_I/E_I* ont été observés dans les populations bovines françaises testées. Les génotypes de quelques échantillons ont été établis pour neuf populations ou races bovines françaises (Tableau I).

30 Dans le cadre d'une deuxième étude (Tableau II) réalisée sur un plus grand nombre de races bovines différentes, et avec un nombre plus important d'individus par race que dans le cadre de la première étude, l'ensemble des génotypes a été observé à l'exception du génotype *E_I/E^D*.

TABLEAU II

Code Race	RACE	Nbre type	e/e	E/e	e/E1	E1/E1	E/E1	E/E	E/ED	ED/ED	e/ED	E1/ED
14	AUBRAC	68	1	-	2	42	17	6	-	-	-	-
72	GASCONNE	64	-	-	-	23	23	18	-	-	-	-
71	PARTHENAISE	48	-	-	6	23	15	4	-	-	-	-
	MARAICHINE	8	-	-	-	3	4	1	-	-	-	-
23	SALERS	57	56	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	SALERS Noire	4	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
24	BAZADAISE	13	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	BLONDE D'AQUITAINE	27	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	LIMOUSINE	42	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	CHAROLAISE	59	59	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	MAINE ANJOU	58	56	2	-	-	-	-	-	-	-	-
46	MONTBELARDE	39	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	NORMANDE	75	-	-	-	-	-	75	-	-	-	-
57	VOSGIENNE	32	-	-	-	-	-	-	-	24	8	-
66	PRIM/HOLSTEIN	88	-	-	-	-	-	-	-	87	1	-

REVENDICATIONS

1. Utilisation de séquences nucléotidiques correspondant aux différentes formes alléliques du gène *Extension* du génome bovin, encore désigné gène *E*, ou
5 correspondant à des fragments de ces différentes formes alléliques, pour la mise en oeuvre d'un procédé d'identification des différentes populations ou races bovines, ou de différents troupeaux bovins regroupant chacun plusieurs populations ou races bovines.

10 2. Utilisation de séquences nucléotidiques selon la revendication 1, lesdites séquences nucléotidiques correspondant à l'allèle E_I représenté sur la figure 1, ou à des fragments de l'allèle E_I , en combinaison avec les séquences nucléotidiques correspondant aux différentes formes alléliques E , E^D et e , représentées sur la figure 1, ou à des fragments de ces différentes formes alléliques.

15 3. Utilisation de séquences nucléotidiques selon la revendication 1 ou la revendication 2, pour la mise en oeuvre d'une méthode permettant de contrôler, voire de certifier, l'appartenance d'un animal à une population ou race bovine particulière, ou à un troupeau bovin particulier, ou, au contraire, permettant de certifier
20 l'exclusion de cet animal de cette population ou race, ou de ce troupeau particulier.

4. Utilisation de séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les populations ou races bovines ou troupeaux bovins sont d'origine française.

25 5. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle correspond à l'allèle E_I représenté sur la figure 1, ou aux fragments suivants de l'allèle E_I :

- tout fragment contenant la séquence nucléotidique délimitée, d'une part, par le nucléotide situé à la position 285 (plus ou moins deux nucléotides), et, d'autre part,
30 par le nucléotide situé à la position 681 de la séquence nucléotidique de l'allèle E_I représentée sur la figure 1, notamment le fragment de 473 paires de bases de l'allèle E_I représenté sur la figure 2,

- tout fragment contenant la séquence nucléotidique délimitée, d'une part, par un nucléotide situé entre les positions 1 et 285 (plus ou moins deux nucléotides), et,
35 d'autre part, par le nucléotide situé à la position 307, de la séquence nucléotidique de l'allèle E_I représentée sur la figure 1, notamment le fragment de 92 paires de bases délimité par les nucléotides situés aux positions 1 et 92 de la séquence nucléotidique de l'allèle E_I représentée sur la figure 2,

- tout fragment contenant la séquence nucléotidique délimitée, d'une part, par le nucléotide situé à la position 308 ou 328, et, d'autre part, par le nucléotide situé à la position 681 de la séquence nucléotidique de l'allèle E_I représentée sur la figure 1, notamment :

5 . tout fragment contenant la séquence nucléotidique délimitée, d'une part, par le nucléotide situé à la position 308 ou 328, et, d'autre part, par un nucléotide situé entre la position 691 (plus ou moins deux nucléotides), et la position 966 de la séquence nucléotidique de l'allèle E_I représentée sur la figure 1,

10 . le fragment de 381 paires de bases de l'allèle E_I , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle E_I représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides situés aux positions 93 et 473.

6. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle correspond aux fragments suivants de l'allèle E^D :

15 - le fragment de 461 paires de bases de l'allèle E^D représenté sur la figure 2,
 - le fragment de 59 paires de bases de l'allèle E^D , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle E^D représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 59.

20 7. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle correspond aux fragments suivants de l'allèle E :

 - le fragment de 461 paires de bases de l'allèle E représenté sur la figure 2,
 - le fragment de 71 paires de bases de l'allèle E , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle E représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides
25 situés aux positions 1 et 71,
 - le fragment de 369 paires de bases de l'allèle E , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle E représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides situés aux positions 93 et 461.

30 8. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle correspond aux fragments suivants de l'allèle e :

 - le fragment de 460 paires de bases de l'allèle e représenté sur la figure 2,
 - le fragment de 91 paires de bases de l'allèle e , correspondant à la séquence nucléotidique de l'allèle e représentée sur la figure 2, et délimitée par les nucléotides
35 situés aux positions 1 et 91.

9. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la séquence nucléotidique Ia suivante ;

Ia : 5' CCTGGCTGTGTCTGACCTGCTGGTG 3'

5

ou tout fragment d'au moins environ 10 nucléotides contigus de cette séquence Ia, ou toute séquence dérivée de cette séquence Ia, ou d'un fragment susmentionné de cette dernière, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides de ces derniers, lesdits fragments ou séquences dérivées s'hybridant, tout comme la séquence Ia, avec tout ou partie de la séquence nucléotidique complémentaire des séquences nucléotidiques délimitées par les nucléotides situés aux positions 1 et 25, et représentées sur la figure 2, des allèles *E*, *e*, *E^D*, ou *E_I*,

10

15

- la séquence nucléotidique IIa suivante ;

IIa : 5' GATGAATGGGGCGCTGCCTCTTCTG 3'

20

ou tout fragment d'au moins environ 10 nucléotides contigus de cette séquence IIa, ou toute séquence dérivée de cette séquence IIa, ou d'un fragment susmentionné de cette dernière, notamment par suppression et/ou substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides de ces derniers, lesdits fragments ou séquences dérivées s'hybridant, tout comme la séquence IIa, avec tout ou partie des séquences nucléotidiques délimitées par les nucléotides situés aux positions 449 et 473 de l'allèle *E_I*, ou 436 et 461 des allèles *E^D* et *E*, ou 435 et 460 de l'allèle *e*, et représentées sur la figure 2,

25

30

10. Couples d'amorces, dont chacune des deux amorces comprend, indépendamment l'une de l'autre, environ 10 à environ 30 nucléotides, caractérisés en ce qu'ils sont choisis de telle façon que l'une des deux séquences d'un couple d'amorces s'hybride avec une séquence d'environ 10 à environ 30 nucléotides comprise dans la séquence nucléotidique complémentaire de la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et environ 285 des séquences nucléotidiques des allèles *E*, *e*, *E^D*, ou *E_I*, représentées sur la figure 1, tandis que l'autre séquence de ce même couple s'hybride avec une séquence d'environ 10 à environ 30 nucléotides comprise entre les nucléotides situés aux positions 670 et 954 des séquences nucléotidiques des allèles *E* ou *E^D* représentées sur la figure 1, ou comprise entre les

35

nucléotides situés aux positions 669 et 953, ou 682 et 966 des séquences nucléotidiques représentées sur la figure 1 des allèles *e* et *E_I* respectivement.

5 11. Couples d'amorces pour l'amplification génique selon la revendication 10, caractérisé en ce que :

- l'une des amorces est choisie parmi les séquences comprenant la séquence Ia, ou tout fragment ou toute séquence dérivée de cette dernière, selon la revendication 9, ladite amorce étant avantageusement marquée, notamment de manière radioactive ou fluorescente,

10 - tandis que l'autre amorce est choisie parmi les séquences comprenant la séquence IIa, ou tout fragment ou toute séquence dérivée de cette dernière, selon la revendication 9.

15 12. Procédé d'identification de populations ou races bovines, ou de troupeaux bovins regroupant plusieurs populations ou races bovines, ledit procédé étant effectué à partir d'un échantillon biologique prélevé sur l'animal, notamment à partir de sperme, embryon, sang, lait, poils, carcasse, ou viande, ou autres produits dérivés de ces derniers, et permettant de contrôler, voire de certifier, l'appartenance ou la non-appartenance de l'animal sur lequel a été prélevé ledit échantillon biologique à une
20 population ou race bovine, ou à un troupeau bovin particuliers, ce procédé comprenant :

- une étape d'amplification du nombre de copies des différentes formes alléliques du gène *Extension*, à savoir des allèles *E*, et/ou *e*, et/ou *ED*, et/ou *E_I*, et/ou des fragments de ces formes alléliques, spécifiques d'une population ou race bovine
25 ou d'un troupeau déterminés, et susceptibles d'être présents dans ledit échantillon biologique,

- une étape de détection desdites formes alléliques ou fragments de ces dernières, le cas échéant après digestion enzymatique de ces formes alléliques ou fragments, à l'aide d'enzymes de restriction appropriées,

30 - le cas échéant, la détection d'un ou plusieurs autres fragments d'ADN spécifiques de populations ou races bovines déterminées, afin de différencier lesdites populations ou races bovines au sein d'un même cheptel, notamment de fragments d'ADN provenant de l'amplification de gènes ou de parties des gènes impliqués dans la coloration des robes des bovidés.

35

13. Procédé d'identification selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'étape d'amplification du nombre de copies des différentes formes alléliques du gène *E*, ou des fragments de ces formes alléliques, est effectué à l'aide d'un couple

d'amorces selon la revendication 10, permettant l'amplification du nombre de copies de tout allèle E , e , E^D , ou E_I , représentés sur la figure 1, ou du nombre de copies de tout fragment des allèles E , e , E^D , ou E_I , susmentionnés, lesdits fragments comprenant au moins les séquences nucléotidiques délimitées par les nucléotides situés aux positions 285 et 669 sur la figure 1, dans le cas des allèles E et E^D , ou au moins la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 285 et 668 sur la figure 1, dans le cas de l'allèle e , ou au moins la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 285 et 681 sur la figure 1, dans le cas de l'allèle E_I .

14. Procédé d'identification selon la revendication 13 ou la revendication 14, caractérisé en ce que l'étape d'amplification du nombre de copies des différentes formes alléliques du gène E , et/ou des fragments de ces formes alléliques, est effectué à l'aide d'un couple d'amorces selon la revendication 11, permettant l'amplification du nombre de copies des fragments de 461 paires de bases des allèles E et E^D , ou du fragment de 460 paires de bases de l'allèle e , ou du fragment de 473 paires de bases de l'allèle E_I , ces fragments étant représentés sur la figure 2.

15. Procédé d'identification selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que la détection, après l'étape d'amplification, d'une séquence amplifiée contenant au moins la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 285 et 681 de l'allèle E_I représenté sur la figure 1, telle que la séquence amplifiée, lorsque le couple d'amorces utilisé est le couple Ia/IIa selon la revendication 12, correspondant au fragment de 473 paires de bases de l'allèle E_I selon la revendication 6, à savoir d'une séquence amplifiée dont la taille est supérieure de 12 ou de 13 paires de bases par rapport à la taille théorique des autres séquences susceptibles d'être amplifiées respectivement à partir des allèles E et E^D , ou de l'allèle e , à l'aide du couple d'amorces utilisé, correspond à la détection de la présence d'une forme allélique E_I dans l'échantillon étudié.

16. Procédé d'identification selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend, après l'étape d'amplification, et le cas échéant, de détection de l'allèle E_I :

- une étape de digestion enzymatique à l'aide des enzymes de restriction *Acil* et *BsrFI* des différentes formes alléliques du gène E , ou des fragments de ces formes alléliques, ayant été amplifiés,

- suivie d'une étape de détection des éventuels différents fragments d'ADN susceptibles d'être obtenus après traitement par lesdites enzymes, à savoir des fragments d'ADN suivants :

5 . tout fragment d'ADN correspondant à une séquence nucléotidique délimitée d'une part, par un nucléotide situé en l'une des positions 1 à environ 285, et, d'autre part, par le nucléotide situé en position 295 de la séquence nucléotidique de l'allèle E^D représentée sur la figure 1, notamment, lorsque le couple d'amorces utilisé est choisi parmi les couples I/II, et plus particulièrement le couple Ia/IIa selon la revendication 11, le fragment de 59 paires de bases de l'allèle E^D selon la
10 revendication 6, et dont la détection est corrélable à la présence d'une forme allélique E^D dans l'échantillon étudié,

. tout fragment d'ADN correspondant à une séquence nucléotidique délimitée d'une part, par un nucléotide situé en l'une des positions 1 à environ 285, et, d'autre part, par le nucléotide situé en position 307 de la séquence nucléotidique de l'allèle E représentée sur la figure 1, notamment, lorsque le couple d'amorces utilisé est choisi
15 parmi les couples I/II, et plus particulièrement le couple Ia/IIa selon la revendication 11, le fragment de 71 paires de bases selon la revendication 7, correspondant à la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 71 de l'allèle E représentée sur la figure 2, et dont la détection, est corrélable à la présence
20 d'une forme allélique E dans l'échantillon étudié,

. tout fragment d'ADN correspondant à une séquence nucléotidique délimitée d'une part, par un nucléotide situé en l'une des positions 1 à environ 285, et, d'autre part, par le nucléotide situé en position 327 de la séquence nucléotidique de l'allèle e représentée sur la figure 1, notamment, lorsque le couple d'amorces utilisé est choisi
25 parmi les couples I/II, et plus particulièrement le couple Ia/IIa selon la revendication 11, le fragment de 91 paires de bases selon la revendication 8, correspondant à la séquence nucléotidique délimitée par les nucléotides situés aux positions 1 et 91 de l'allèle e représentée sur la figure 2, et dont la détection est corrélable à la présence
30 d'une forme allélique e dans l'échantillon étudié.

17. Procédé d'identification selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que :

- la détection d'un génotype comprenant l'allèle E^D dans l'échantillon biologique étudié, permet de certifier que ledit échantillon provient d'un animal
35 appartenant à l'une des populations ou races bovines dites "noires", telles que les races Vosgienne, Holstein, ou Salers Noire,

- la détection d'un génotype comprenant l'allèle E_I dans l'échantillon biologique étudié, permet de certifier que ledit échantillon provient d'un animal appartenant à

l'une des populations ou races bovines suivantes : Aubrac, Gasconne, Parthenaise, ou Maraîchine,

5 - la détection d'un génotype comprenant l'allèle e , mais ne comprenant pas l'allèle E_I ou E^D dans l'échantillon biologique étudié, permet de certifier que ledit échantillon provient d'un animal appartenant à l'une des populations ou races bovines dites "rouges", telles que les races Salers, Maine Anjou, Bazadaise, Limousine, Charolaise, Blonde d'Aquitaine, ou Montbéliarde,

10 - la détection du génotypes E/E , dans l'échantillon biologique étudié, permet de contrôler que les animaux sont supposés appartenir principalement à la population ou race bovine française Normande.

15 18. Kit pour la mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 12 à 17, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un couple d'amorces selon la revendication 10 ou 11.

1/5

Allèle E	ATGCCTGCACTTGGCTCCCAGAGGCGGCTGCTGGGCTCCCTTAACTGCACGCCCCCAGCC 60
Allèle e	ATGCCTGCACTTGGCTCCCAGAGGCGGCTGCTGGGTTCCCTTAACTGCACGCCCCCAGCC 60
Allèle E ^D	ATGCCTGCACTTGGCTCCCAGAGGCGGCTGCTGGGTTCCCTTAACTGCACGCCCCCAGCC 60
Allèle E ₁	ATGCCTGCACTTGGCTCCCAGAGGCGGCTGCTGGGTTCCCTTAACTGCACGCCCCCAGCC 60
Allèle E	ACCCTCCCCTTCACCCTGGCCCCCAACCGACGGGGCCCCAGTGCCTGGAGGTGTCCATC 120
Allèle e	ACCCTCCCCTTCACCCTGGCCCCCAACCGACGGGGCCCCAGTGCCTGGAGGTGTCCATC 120
Allèle E ^D	ACCCTCCCCTTCACCCTGGCCCCCAACCGACGGGGCCCCAGTGCCTGGAGGTGTCCATC 120
Allèle E ₁	ACCCTCCCCTTCACCCTGGCCCCCAACCGACGGGGCCCCAGTGCCTGGAGGTGTCCATC 120
Allèle E	CCTGACGGGCTCTTTCTCAGCCTGGGGCTGGTGAGTCTCGTGGAGAACGTGCTGGTAGTG 180
Allèle e	CCTGACGGGCTCTTTCTCAGCCTGGGGCTAGTGAGTCTCGTGGAGAACGTGCTGGTAGTG 180
Allèle E ^D	CCTGACGGGCTCTTTCTCAGCCTGGGGCTGGTGAGTCTCGTGGAGAACGTGCTGGTAGTG 180
Allèle E ₁	CCTGACGGGCTCTTTCTCAGCCTGGGGCTGGTGAGTCTCGTGGAGAACGTGCTGGTAGTG 180
Allèle E	GCTGCCATTGCCAAGAACCAGCAACCTGCACTCCCCCATGTACTACTTTATCTGCTGCCTG 240
Allèle e	GCTGCCATTGCCAAGAACCAGCAACCTGCACTCCCCCATGTACTACTTTATCTGCTGCCTG 240
Allèle E ^D	GCTGCCATTGCCAAGAACCAGCAACCTGCACTCCCCCATGTACTACTTTATCTGCTGCCTG 240
Allèle E ₁	GCTGCCATTGCCAAGAACCAGCAACCTGCACTCCCCCATGTACTACTTTATCTGCTGCCTG 240
Allèle E	GCTGTGTCTGACTTGCTGGTGAGCGTCAGCAACGTGCTGGAGACGGCAGTCATGC TGCTG 300
Allèle e	GCTGTGTCTGACTTGCTGGTGAGCGTCAGCAACGTGCTGGAGACGGCAGTCATGC TGCTG 300
Allèle E ^D	GCTGTGTCTGACTTGCTGGTGAGCGTCAGCAACGTGCTGGAGACGGCAGTCATGC CGCTG 300
Allèle E ₁	GCTGTGTCTGACTTGCTGGTGAGCGTCAGCAACGTGCTGGAGACGGCAGTCATGC TGCTG 300
Allèle E	CTGGAGGCC GGTGTCTTGGCCACCCAGGCGGCCGTGGTGAGCAGCTGGACAATGTCATC 360
Allèle e	CTGGAGGCC -GTGTCTTGGCCACCCAGGCGGCCGTGGTGAGCAGCTGGACAATGTCATC 359
Allèle E ^D	CTGGAGGCC GGTGTCTTGGCCACCCAGGCGGCCGTGGTGAGCAGCTGGACAATGTCATC 360
Allèle E ₁	CTGGAGGCC GGTGTCTTGGCCACCCAGGCGGCCGTGGTGAGCAGCTGGACAATGTCATC 360

AciI

BsrFI

Figure 1

2 / 5

Allèle E	GACGTGCTCATCTGCGGATCCATGGTGTCAGCCTCTGCTTCCTGGGTGCCATTGCTGTG 420
Allèle e	GACGTGCTCATCTGCGGATCCATGGTGTCAGCCTCTGCTTCCTGGGTGCCATTGCTGTG 419
Allèle E ^D	GACGTGCTCATCTGCGGATCCATGGTGTCAGCCTCTGCTTCCTGGGTGCCATTGCTGTG 420
Allèle E ₁	GACGTGCTCATCTGCGGATCCATGGTGTCAGCCTCTGCTTCCTGGGTGCCATTGCTGTG 420
Allèle E	GACCGCTACATCTCCATCTTCTACGCCCTGCGGTACCACAGTGTTGTGACACTGCCCCGA 480
Allèle e	GACCGCTACATCTCCATCTTCTACGCCCTGCGGTACCACAGTGTTGTGACACTGCCCCGA 479
Allèle E ^D	GACCGCTACATCTCCATCTTCTACGCCCTGCGGTACCACAGTGTTGTGACACTGCCCCGA 480
Allèle E ₁	GACCGCTACATCTCCATCTTCTACGCCCTGCGGTACCACAGTGTTGTGACACTGCCCCGA 480
Allèle E	GCGTGGAGGATCATTGCGGCCATCTGGGTGGCCAGCATCCTCACCAGCCTGCTCTTCATC 540
Allèle e	GCGTGGAGGATCATTGCGGCCATCTGGGTGGCCAGCATCCTCACCAGCCTGCTCTTCATC 539
Allèle E ^D	GCGTGGAGGATCATTGCGGCCATCTGGGTGGCCAGCATCCTCACCAGCCTGCTCTTCATC 540
Allèle E ₁	GCGTGGAGGATCATTGCGGCCATCTGGGTGGCCAGCATCCTCACCAGCCTGCTCTTCATC 540
Allèle E	ACCTACTACAACCACAAGGTCATCCTGCTGTGCCTCGTTGGCCTCTTCATAGCTATGCTG 600
Allèle e	ACCTACTACAACCACAAGGTCATCCTGCTGTGCCTCGTTGGCCTCTTCATAGCTATGCTG 599
Allèle E ^D	ACCTACTACAACCACAAGGTCATCCTGCTGTGCCTCGTTGGCCTCTTCATAGCTATGCTG 600
Allèle E ₁	ACCTACTACAACCACAAGGTCATCCTGCTGTGCCTCGTTGGCCTCTTCATAGCTATGCTG 600
Allèle E	GCCCTGATGGCCGTCCTCTACGTCCACATGCTGGCCCGGGCCTGCCAGCATGCCCGGGGC 660
Allèle e	GCCCTGATGGCCGTCCTCTACGTCCACATGCTGGCCCGGGCCTGCCAGCATGCCCGGGGC 659
Allèle E ^D	GCCCTGATGGCCGTCCTCTACGTCCACATGCTGGCCCGGGCCTGCCAGCATGCCCGGGGC 660
Allèle E ₁	GCCCTGATGGCCGTCCTCTACGTCCACATGCTGGCCCGGGCCTGCCAGCATGCCCGG GGC 660
Allèle E	ATTGCCCGG-----CTCCAGAAGAGGCAGCGCCCCATTTCATCAGGGCTTTGGC 708
Allèle e	ATTGCCCGG-----CTCCAGAAGAGGCAGCGCCCCATTTCATCAGGGCTTTGGC 707
Allèle E ^D	ATTGCCCGG-----CTCCAGAAGAGGCAGCGCCCCATTTCATCAGGGCTTTGGC 708
Allèle E ₁	ATTGCCCGGGGCATTGCCCGGCTCCAGAAGAGGCAGCGCCCCATTTCATCAGGGCTTTGGC 720

Figure 1 (suite 1)

3 / 5

Allèle E	CTCAAGGGCGCTGCCACCCTCACCATCCTGCTGGGCGTCTTCTTCCTCTGCTGGGGCCCC 768
Allèle e	CTCAAGGGCGCTGCCACCCTCACCATCCTGCTGGGCGTCTTCTTCCTCTGCTGGGGCCCC 767
Allèle E ^D	CTCAAGGGCGCTGCCACCCTCACCATCCTGCTGGGCGTCTTCTTCCTCTGCTGGGGCCCC 768
Allèle E ₁	CTCAAGGGCGCTGCCACCCTCACCATCCTGCTGGGCGTCTTCTTCCTCTGCTGGGGCCCC 780
Allèle E	TTCTTCCTGCACCTCTCGCTCATCGTCCTCTGCCCCCAGCACCCACCTGTGGCTGCATC 828
Allèle e	TTCTTCCTGCACCTCTCGCTCATCGTCCTCTGCCCCCAGCACCCACCTGTGGCTGCATC 827
Allèle E ^D	TCCTTCCTGCACCTCTCGCTCATCGTCCTCTGCCCCCAGCACCCACCTGTGGCTGCATC 828
Allèle E ₁	TTCTTCCTGCACCTCTCGCTCATCGTCCTCTGCCCCCAGCACCCACCTGTGGCTGCATC 840
Allèle E	TTCAAGAACTTCAACCTCTTCCTGGCCCTCATCATTGCAACGCCATTGTGGACCCCTC 888
Allèle e	TTCAAGAACTTCAACCTCTTCCTGGCCCTCATCATTGCAACGCCATTGTGGACCCCTC 887
Allèle E ^D	TTCAAGAACTTCAACCTCTTCCTGGCCCTCATCATTGCAACGCCATTGTGGACCCCTC 888
Allèle E ₁	TTCAAGAACTTCAACCTCTTCCTGGCCCTCATCATTGCAACGCCATTGTGGACCCCTC 900
Allèle E	ATCTATGCCTTCCGCAGCCAGGAGCTCCGGAAGACGCTCCAAGAGGTGCTGCAGTGCTCC 948
Allèle e	ATCTATGCCTTCCGCAGCCAGGAGCTCCGGAAGACGCTCCAAGAGGTGCTGCAGTGCTCC 947
Allèle E ^D	ATCTATGCCTTCCGCAGCCAGGAGCTCCGGAAGACGCTCCAAGAGGTGCTGCAGTGCTCC 948
Allèle E ₁	ATCTATGCCTTCCGCAGCCAGGAGCTCCGGAAGACGCTCCAAGAGGTGCTGCAGTGCTCC 960
Allèle E	TGGTGA----- 954
Allèle e	TGGTGA----- 953
Allèle E ^D	TGGTGA----- 954
Allèle E ₁	TGGTGA----- 966

Figure 1 (suite 2)

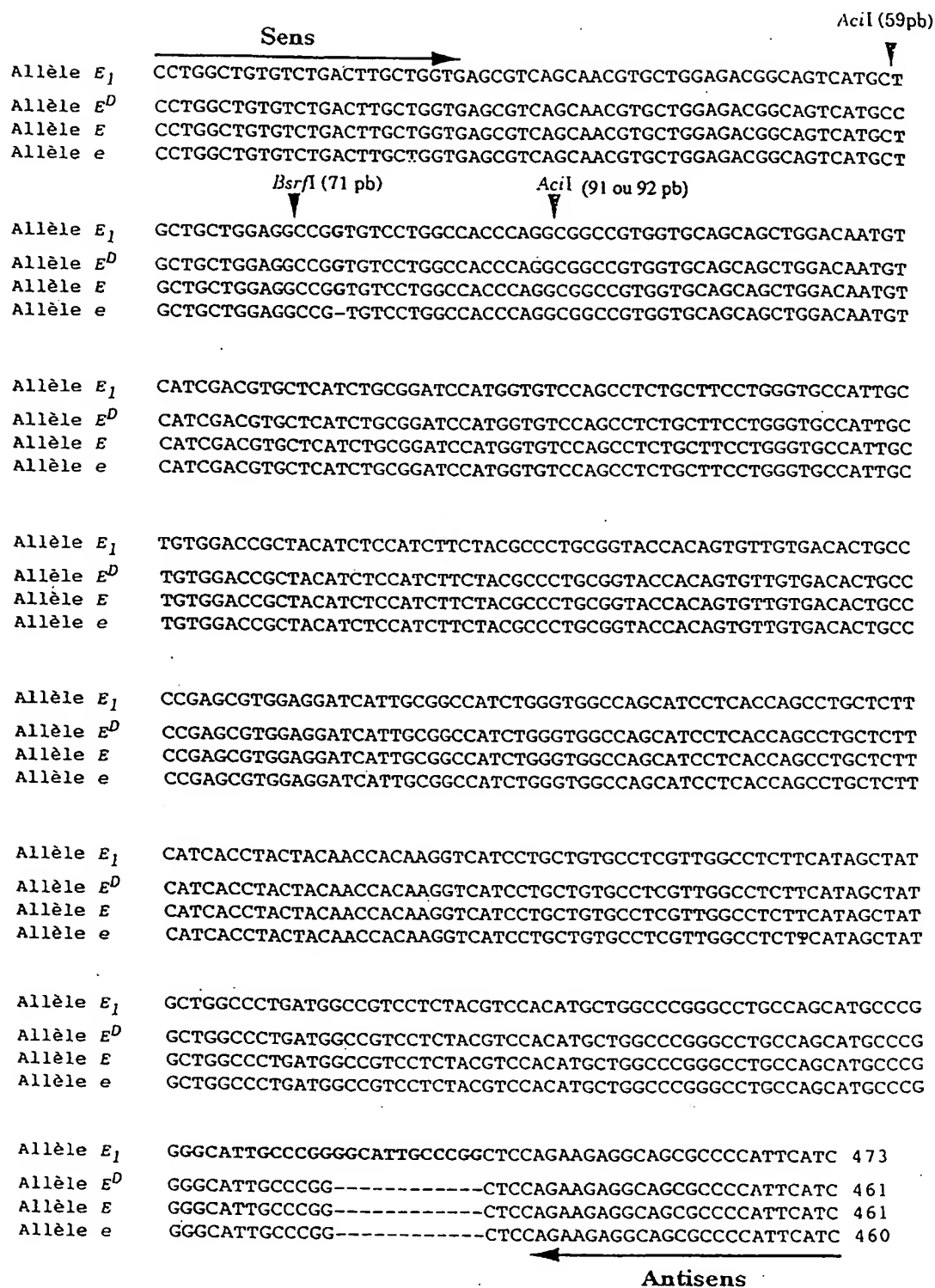


Figure 2

* : La lecture de ces analyses doit être faite horizontalement.

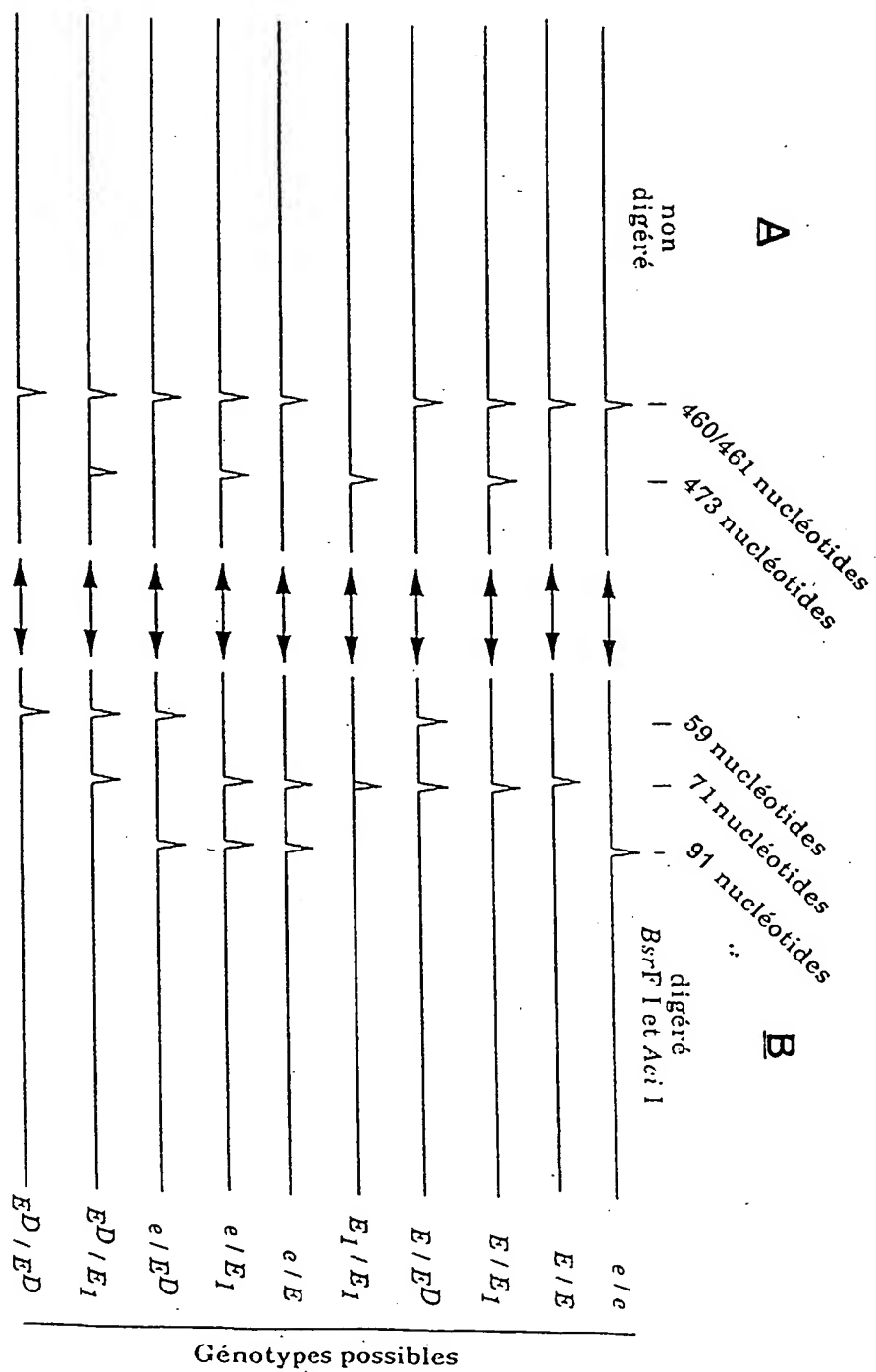


Figure 3

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.